

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie



Zuzana Handlová

**POROVNÁVÁNÍ KALIBRAČNÍCH METOD  
PRO STANOVENÍ CHININU V NÁPOJÍCH**

**Comparison of Calibration Methods  
for Determination of Quinine in Beverages**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Praha 2020

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze 6. ledna 2020

## Abstrakt

Tato bakalářská práce porovnává tři vybrané kalibrační metody při stanovení chininu v nápojích dvěma instrumentálními metodami. Jsou to metoda kalibrační závislosti, metoda přidavku standardu a metoda přidavku po změření vlastnosti (označovaná jako metoda spike). Jako instrumentální metody byly vybrány spektrometrie v UV oblasti a RP–HPLC s UV a fluorescenční detekcí. Kalibrační metody jsou porovnávány z hlediska pravdivosti, preciznosti a časové náročnosti. Instrumentální metody jsou vzájemně porovnány z hlediska pravdivosti. Jako autentické vzorky bylo zvoleno pět druhů toniků zakoupených v běžné maloobchodní síti. Nejpreciznější hodnoty poskytla metoda kalibrační závislosti. Z hlediska pravdivosti nebylo možné určit, která z kalibračních metod je nejpravdivější. Časově nejméně náročné bylo spikování. Pravdivější hodnoty z instrumentálních metod poskytla HPLC.

**Klíčová slova:** analytická kalibrace, spektrometrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, chinin

## Abstract

The aim of this bachelor thesis is to compare three calibration methods used for determination of quinine in beverages performed by two instrumental methods. As the calibration methods, calibration curve method, standard addition method and spike were chosen. As the instrumental methods, UV spectrometry and RP–HPLC with UV and fluorescence detection were chosen. The calibration methods were compared in terms of accuracy, precision, and time consumption. The instrumental methods were compared in terms of accuracy. Five different tonic waters were chosen as authentic samples. The most precise results were provided by the calibration curve method. In terms of accuracy it was not possible to determine the most accurate calibration method. Spike was the least time-consuming calibration method. HPLC was more accurate compared to spectrometry.

**Key words:** analytical calibration, spectrometry, high performance liquid chromatography, quinine

## Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat mému vždy ochotnému školiteli doc. RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za velmi cenné rady, odborné konzultace a pomoc při psaní této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině a blízkým, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

# Obsah

1	Cíl práce .....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Chinin .....	8
2.1.1	Chemické vlastnosti chininu .....	9
2.1.2	Struktura chininu a jeho syntéza .....	9
2.1.3	Stanovení chininu .....	11
2.2	Tonik .....	12
2.3	Analytická kalibrace.....	12
3	Experimentální část .....	14
3.1	Analyzované vzorky .....	14
3.2	Použité chemikálie a roztoky .....	14
3.3	Přístroje a experimentální podmínky .....	15
3.4	Postup měření metodou spektrometrie .....	15
3.5	Postup měření metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.....	16
3.6	Zpracování dat.....	17
4	Výsledky a diskuze.....	21
4.1	Stanovení chininu ve vzorcích metodou UV spektrometrie.....	21
4.2	Stanovení chininu ve vzorcích metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.....	27
4.3	Porovnání výsledků stanovení chininu v nápojích získaných na dvou různých spektrometrech s pomocí tří standardních roztoků chininu.....	31
4.4	Porovnání výsledků stanovení chininu v nápojích získaných pomocí různých kalibračních a instrumentálních metod.....	32
5	Závěr.....	35
	Literatura .....	37

## Seznam použitých zkratk

<i>a</i>	směrnice kalibrační závislosti
<i>A</i>	absorbance
ANOVA	analýza rozptylu (angl. analysis of variance)
<i>b</i>	úsek kalibrační závislosti
<i>c</i>	koncentrace [ $\text{mg dm}^{-3}$ ]
CITP	kapilární isotachoforéza (angl. capillary isotachopheresis)
CZE	kapilární zónová elektroforéza (angl. capillary zone electrophoresis)
DAD	detektor s diodovým polem (angl. diode array detector)
ESI	ionizace elektrosprejem (angl. electrospray ionization)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (angl. high performance liquid chromatography)
IPC	iontová párová chromatografie (angl. ion pair chromatography)
LIF	laserem indukovaná fluorescence (angl. laser induced fluorescence)
<i>LOD</i>	mez detekce (angl. limit of detection)
<i>LOQ</i>	mez stanovitelnosti (angl. limit of quantification)
MKZ	metoda kalibrační závislosti
MPS	metoda přídavku standardu
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (angl. tandem mass spectrometry)
MSpike	metoda přídavku po změření vlastnosti
<i>n</i>	počet kalibračních bodů
NMR	nukleární magnetická rezonance (angl. nuclear magnetic resonance)
RP	obrácené fáze (angl. reversed phase)
<i>s<sub>a</sub></i>	standardní odchylka směrnice regresní přímky
<i>s<sub>b</sub></i>	standardní odchylka úseku regresní přímky
<i>s<sub>r</sub></i>	standardní odchylka regresní přímky
<i>s<sub>cE</sub></i>	standardní odchylka stanovené koncentrace
<i>V</i>	objem [ml]
UV	ultrafialové (angl. ultraviolet)
ZF	zónová fluidika (angl. zone fluidics)

# 1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je srovnání tří různých kalibračních metod (metoda přídavku standardu, metoda kalibrační závislosti a metoda přídavku po změření vlastnosti) pro stanovení chininu v pěti různých tonicích z hlediska přesnosti, preciznosti a časové náročnosti. Jako instrumentální metody pro stanovení byly vybrány spektrometrie v UV oblasti a RP–HPLC s UV a fluorescenční detekcí. Kalibrace je hlavní faktor, na kterém závisí přesnost a preciznost celého analytického stanovení (pokud se nejedná o absolutní analytické metody). Cílem práce je také zjistit, zda má na výsledky stanovení vliv použití různých zásobních standardních roztoků a různých spektrometrů.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Chinin

Chinin je látka vyskytující se běžně v přírodě [1–3]. Z medicínálního hlediska hraje chinin významnou roli v lidské společnosti už po stovky let. Působí jako lék proti malárii, proti svalovým křečím nebo při chřipkových infekcích. Má antipyretické, antiseptické a analgetické vlastnosti. Dále se využívá jako přídavek do některých farmaceutických přípravků [4].

Chinin se získává izolací z kůry chinovníku (*Cinchona officinalis* L.). Reprezentuje asi 70–90 % alkaloidů této kůry. Dnes se chinin podává orálně ve formě solí minerálních kyselin, nejčastěji ve formě dihydrochloridu [1].

Nejrozšířenější a nejdůležitější použití chininu je dnes v potravinářském průmyslu [2–4]. Chinin je přidáván do nápojů jako jsou toniky nebo bitter lemon (tonik s příchutí citronu), které obvykle obsahují přibližně 80 mg dm<sup>-3</sup> chininu. Je charakteristický typickou hořkou chutí, proto se užívá jako dochucovadlo.

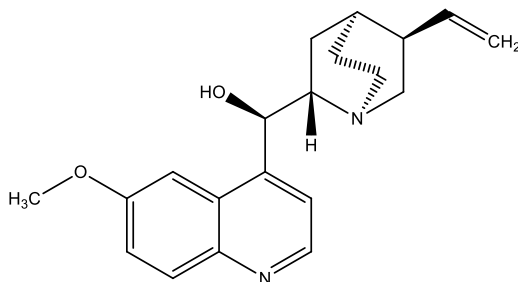
Chinin je toxický, smrtná dávka pro dospělého člověka je asi 8 gramů [1, 5, 6]. Při užívání nadměrných dávek se mohou projevit vedlejší účinky jako střevní, kardiovaskulární nebo neurologické potíže. Projevují se bolestmi hlavy, zvracením, nevolností, závratěmi, průjmem nebo bolestí břicha, v krajních případech až ztrátou zraku, poškozením jater nebo psychózou. Byly zaznamenány i alergie na chinin, které se projevíly anafylaktickým šokem po vypití jedné sklenice toniku. Konzumace chininu není doporučována těhotným ženám a dětem.

Z důvodů výše uvedených je v některých zemích obsah chininu v nápojích omezen [7]. Například v Číně je přidávání chininu do nápojů zakázáno, ve Spojených státech amerických je maximální obsah chininu omezen na 83 mg kg<sup>-1</sup>. Evropská komise nařídila pravidla ohledně označení obsahu chininu na obalech.



### 2.1.1 Chemické vlastnosti chininu

Z chemického hlediska patří chinin mezi rostlinné alkaloidy [1]. Alkaloidy reagují alkalicky díky atomům dusíku, které jsou v alkaloidech obvykle přítomny. Mají silný fyziologický účinek na lidské i zvířecí organismy.



**Obrázek 2.1** Struktura molekuly chininu

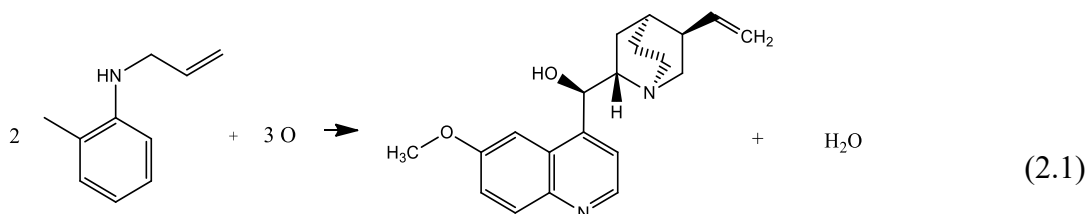
Struktura chininu je uvedena na obr. 2.1, jeho sumární vzorec je  $C_{20}H_{24}N_2O_2$ , systematický název chininu je *(R)*-[(2*S*,4*S*,5*R*)-5-ethenyl-1-azabicyklo[2.2.2]oktan-2-yl](6-methoxychinolin-4-yl)-methanol a má číslo CAS 130-95-0 (cit. [6]). Relativní molekulová hmotnost chininu je 324,42. Chinin se jako hydrochlorid vyskytuje ve formě prášku nebo jemných bezbarvých nebo bílých krystalů ve tvaru jehliček, často seskupených do shluků. Vodný 1% roztok hydrochloridu chininu má rozmezí pH od 6,0 do 7,0.

### 2.1.2 Struktura chininu a jeho syntéza

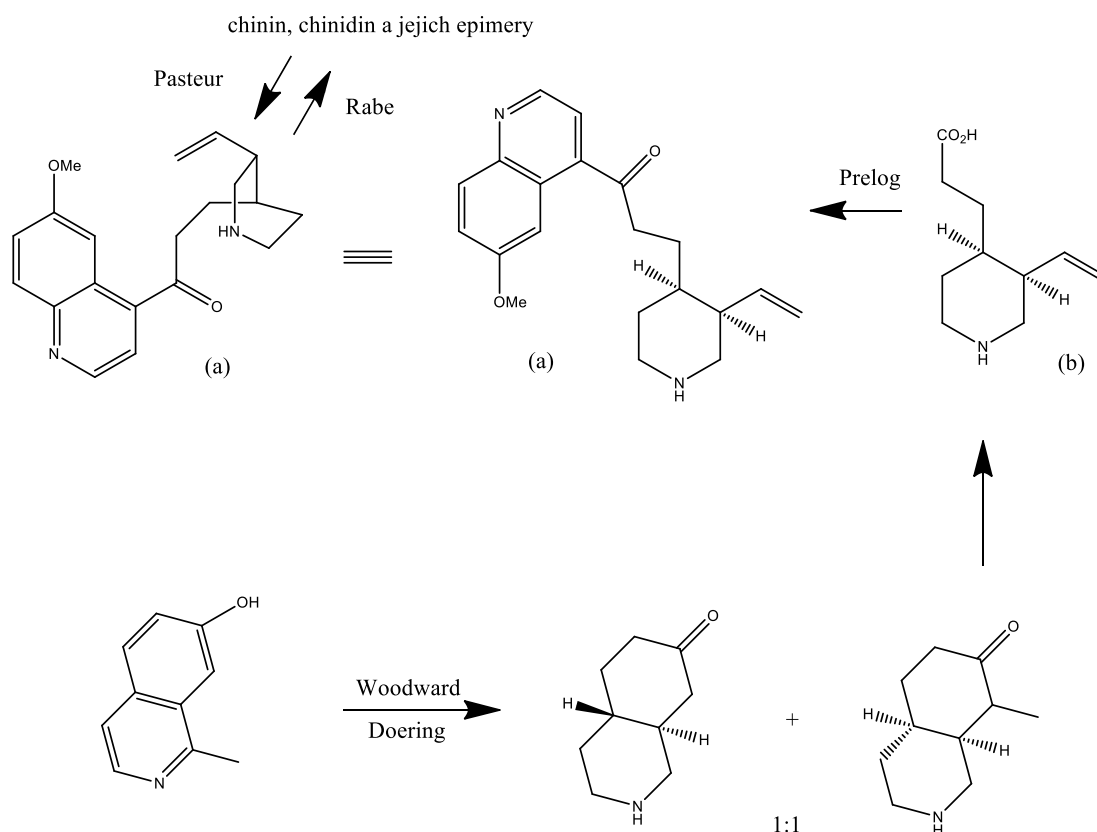
Nejdůležitější techniky pro stanovení struktury přírodních produktů jsou hmotnostní spektrometrie, nukleární magnetická rezonance (NMR) a rentgenová strukturní analýza (rentgenová krystalografie) [8]. Většinu látek je možno stanovit pomocí prvních dvou jmenovaných technik. Pro užití rentgenové strukturní analýzy je potřeba, aby studovaná látka byla schopna produkovat krystaly dobré kvality. Na přelomu 19. a 20. století byly tyto metody velmi vzácné. Většinu postupů organické chemie za účelem objasnění struktury tehdy tvořily metody destruktivní jako derivatizace, degradace a spalování. Snaha objasnit strukturu chininu trvala proto více než 50 let. Dnes by určení struktury neznámé přírodní látky trvalo pravděpodobně nanejvýš několik dní. Rozměry výzkumu

struktury chininu široce přesáhly jeho původní účel, výsledky vedoucí k objasnění struktury chininu a příbuzných alkaloidů se značně podílejí na našich současných znalostech o derivátech pyridinu a chinolinu.

První pokus syntetizovat chinin provedl William Henry Perkin roku 1856 [7, 9, 10], kdy zkoušel syntetizovat chinin oxidací *N*-allyltoluidinu podle rovnice



Tato syntéza chininu byla neúspěšná. Správné spojení atomů chininu, který obsahuje čtyři asymetrické uhlíky, nebylo tehdy ještě známo. Na tomto objevu se zásadně podílel německý chemik Paul Rabe, který nad možností syntézy tohoto alkaloidu začal také uvažovat. Kvůli čtyřem stereogenním centrům chininu má tato molekula 16 možných isomerických struktur. Roku 1918 i přesto, že neznal stereochemii, se Rabe rozhodl pro syntézu chininu z 3,4-disubstituovaného piperidinu. Ten byl už dříve získán kysele katalyzovanou izomerací chininu Pasteurem. O dvacet pět let později Prelog a Proštenik ukázali, že 3-vinyl-4-piperidinpropionová kyselina získaná degradací chinotoxinu jako jeho enantiomer může být přeměněna na tentýž 3,4-disubstituovaný piperidin. Tím doplnili cestu k syntéze chininu za předpokladu platnosti Rabeho experimentu. Celková formální syntéza chininu byla dokončena Woodwardem a Doeringem v roce 1944, kdy úspěšně syntetizovali samotnou 3-vinyl-4-piperidinpropionovou kyselinu. Tato syntéza chininu ovšem nebyla stereoselektivní, vznikala při ní směs stereoizomerů. Schéma celé syntézy je znázorněno na obr. 2.2.



**Obrázek 2.2** Schéma syntézy chininu: (a) 3,4-disubstituovaný piperidin, (b) 3-vinyl-4-piperidin-propionová kyselina (upraveno podle [9])

První úplně stereoselektivní syntéza chininu byla provedena Storkem v roce 2000 [9]. Syntézy chininu jsou z ekonomického hlediska oproti izolaci z kůry chinovníku nevýhodné, proto se chinin získává stále izolací z přírodních zdrojů [1].

### 2.1.3 Stanovení chininu

Vzhledem k jeho značné biologické aktivitě je stanovení chininu v různých vzorcích často žádané. Nejčastěji se obsah chininu stanovuje v nápojích a farmaceutických přípravcích. Chinin absorbuje UV záření, proto je nejjednodušší formou detekce UV detekce. Stanovení chininu v nápojích bylo provedeno například metodami kapilární isotachografie [11, 12], iontová párová chromatografie [13] a vysokoúčinná kapalinová chromatografie [5, 7, 14]. Přehled uvedených metod je uveden v tab. 2.1.

**Tabulka 2.1**

Příklady stanovení chininu v nápojích a farmaceutických přípravcích

Metoda	Detekce	$LOD / \mu\text{g dm}^{-3}$	$LOQ / \mu\text{g dm}^{-3}$	Vzorek	Ref.
CTIP–CZE	UV DAD spektrometrie	2,3	7,6	nápoje	[11]
CITP	UV absorpce	$5 \cdot 10^3$	— <sup>a</sup>	nápoje, farmaceutické přípravky, moč	[12]
RP IPC	UV spektrometrie	$0,02 \cdot 10^{-3}$	— <sup>a</sup>	nápoje	[13]
	fluorimetrie	$0,004 \cdot 10^{-3}$	— <sup>a</sup>		
HPLC	LIF	0,64	1	nápoje	[5]
ZF–HPLC	UV/Vis spektrometrie	250	800	nápoje	[7]
RP HPLC	UV DAD spektrometrie	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	historické farmaceutické přípravky	[14]
	/ESI-MS/MS				

<sup>a</sup> Údaj není k dispozici

Stanovení chininu a dalších alkaloidů bylo pomocí HPLC s UV detekcí a fluorescenční detekcí provedeno také přímo z kůry chinovníku [15, 16].

## 2.2 Tonik

Tonik, jak ho známe dnes, byl navrhnut na konci 18. století jako „sodová voda“ německo-švýcarským hodinářem J. J. Schweppem [17–19]. Je to perlivý, nealkoholický nápoj obsahující chinin. Jiná forma tohoto nápoje je tzv. bitter lemon, neboli tonik s příchutí citronu, který stejně jako obyčejný tonik obsahuje malé množství chininu. Od roku 1792 byl tonik pod názvem Schweppes produkován také v Londýně. Dnes obsahuje 1 litr Schweppes Indian toniku pouze asi 70 mg chininu, což by na terapii proti malárii nestačilo.

## 2.3 Analytická kalibrace

Kalibrace je zásadní krok v téměř každém analytickém stanovení [20–22]. V analytické chemii zůstává klíčovým krokem navzdory inovacím v metodice i instrumentaci. Pomocí kalibrace zjišťujeme koncentraci stanovované látky (analytu) ve

vzorku. Pro chemickou analýzu jsou využívány přístroje, které poskytují odezvy ve formě intenzity signálu. Signály odpovídají analytické koncentraci analytu, ale nestanovují ji přímo. Převedení signálu na analytickou koncentraci co možná nejpřesněji je tedy hlavní úkol kalibrace.

Z praktického hlediska má kalibrace čtyři fáze: fáze preparativní (příprava vzorku a standardů), fáze měření (odečtení intenzity signálů vzorku a standardů), fáze modelování (formulace kalibrační funkce) a fáze transformační (vypočtení výsledků) (cit. [21]).

Nejpoužívanější kalibrační metodou je dnes metoda kalibrační závislosti [20, 21]. Její postup je relativně rychlý a jednoduchý. Spočívá ve vytvoření kalibrační řady několika standardních vzorků, které obsahují analyt v různých koncentracích. Vzorek je analyzován zvlášť. Z naměřených signálů se vytvoří kalibrační funkce, pomocí které se stanoví koncentrace analytu. K výpočtu analytické koncentrace analytu je využita interpolace. Při uplatnění interferenčního efektu může být tato metoda nepřesná. Při nelineární kalibrační závislosti je vzniklá chyba zanedbatelná, pokud je počet standardních roztoků dostatečný.

Další kalibrační metoda využitá v této práci je metoda přídavku standardu. Princip této metody je založen na přídavku standardního roztoku o zvyšující se koncentraci analytu ke vzorku tím způsobem, že se koncentrace analytu a dalších složek vzorku nemění. Kalibrační funkce je vytvořena pro analyt o zvyšující se koncentraci, který je přidáván ke vzorku. Analytická koncentrace stanovované látky je stanovena extrapolací funkce na nulový signál. Výhoda této metody spočívá v obklopení standardů i vzorku stejnými interferenty, tím se eliminují interferenční efekty. Naproti tomu systematická chyba způsobená nelineárním efektem může být kvůli extrapolaci značná.

Poslední kalibrační metoda je kalibrační metoda přídavku standardu po změření vlastnosti (označovaná jako metoda spike). Jedná se o modifikaci metody přídavku standardu s jediným přídavkem. Princip spočívá ve změření vlastnosti roztoku vzorku o daném objemu (v této práci absorbance u spektrometrie a plochy píku u HPLC) a následného přidání známého objemu standardního roztoku (označovaného jako spikování, z angl. to spike = okořenit) a změření vlastnosti vzniklého roztoku. Odezvy těchto dvou měření jsou porovnány a na základě jejich rozdílu je stanovena koncentrace analytu ve vzorku.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Analyzované vzorky

Jako analyzované vzorky bylo použito pět různých druhů toniků obsahujících chinin. Nápoje byly zakoupeny v běžně dostupných obchodech s potravinami. Konkrétní popis vzorků je shrnut v tab. 3.1. Kromě jednoho druhu není obsah chininu ve vzorcích výrobcem na etiketě uveden.

**Tabulka 3.1**

Analyzované vzorky toniků v bakalářské práci

Vzorek	Komerční název	Výrobce, číslo šarže
1	Schweppes Indian tonic original	Karlovarské minerální vody, ČR, E13032227
2	Kinley tonic water	Coca Cola, ČR, R06P16:17HL
3	River Indian tonic water <sup>a</sup>	Maspex, ČR, 904022ZP
4	Red Bull Organics tonic water	Red Bull, Rakousko, 664503/14:14
5	Thomas Henry cherry blossom tonic	Thomas Henry, Německo, 1901008

<sup>a</sup> Výrobce udává maximální obsah chininu 35 mg dm<sup>-3</sup>

### 3.2 Použité chemikálie a roztoky

K přípravě standardních roztoků chininu byl použit quinine hydrochloride dihydrate (tested according to Ph. Eur., Sigma-Aldrich). K přípravě směsi kyselin byly použity kyselina chlorovodíková (35%, p.a., Lach-Ner, ČR) a kyselina fosforečná (85%, p.a., Lach-Ner). Byla použita destilovaná voda, v případě HPLC byla použita MilliQ voda. K přípravě mobilních fází byly použity octan amonný (p.a., Lach-Ner, ČR) a acetonitril (pro HPLC, Macron Fine Chemicals, USA).

Pro kalibraci byly připraveny tři standardní roztoky chininu přesným odvážením substance chininu a jeho rozpuštěním v odměrné baňce. Koncentrace získaných standardních roztoků jsou uvedeny v tab. 3.2.

**Tabulka 3.2**

Koncentrace standardních roztoků chininu použitých v bakalářské práci

<b>Roztok</b>	<b><math>c(\text{chinin}) / \text{mg dm}^{-3}</math></b>
Standard 1	100,16
Standard 2	100,56
Standard 3	100,12

### 3.3 Přístroje a experimentální podmínky

Při přípravě mobilní fáze byl použit pH metr 3510 (Jenway, UK) se skleněnou elektrodou HC103 (Theta, ČR). Elektroda byla před měřením kalibrována třibodovou kalibrací na standardní pufrů  $\text{pH} = 3,00, 7,00$  a  $10,00$ .

Jako spektrometr 1 byl použit přístroj Hewlett Packard 8453 (Serial No. DE52400236), spektrometr 2 byl přístroj Agilent 8453 (Serial No. CN22808535).

Pro analýzu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byl použit chromatograf UHPLC Nexera XR (Shimadzu, Japan). Experimentální podmínky pro metodu HPLC byly převzaty z práce [14] a následně modifikovány.

### 3.4 Postup měření metodou spektrometrie

Analyzované vzorky toniků byly vždy před měřením zbaveny rozpuštěného oxidu uhličitého pomocí ultrazvukové lázně. Doba působení ultrazvuku byla 15–25 min dle potřeby.

Celé měření bylo prováděno na dvou různých spektrometrech. Pro úpravu prostředí byl použit roztok směsi kyselin připravený tak, aby konečná koncentrace kyseliny chlorovodíkové byla  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  a kyseliny fosforečné  $1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ . Jako kalibrační metody byly použity metoda kalibrační závislosti, metoda přidavku standardu a metoda přidavku po změření vlastnosti (spike). Do odměrných baněk o objemu 25,00 ml byl postupně pipetován vzorek, 5,00 ml směsi kyselin chlorovodíkové a fosforečné a příslušné množství standardního roztoku chininu dle tab. 3.3. Následně byly roztoky naředěny po rysku destilovanou vodou.

**Tabulka 3.3**

Příprava roztoků pro stanovení chininu v tonicích metodou spektrometrie: MPS – metoda přidavku standardu, MKZ – metoda kalibrační závislosti, baňky S označují metodu přidavku standardu, baňky K metodu kalibrační závislosti (do každé baňky bylo navíc pipetováno 5,00 ml směsi kyselin a následně byly 25,00 ml baňky doplněny po rysku destilovanou vodou)

Kalibrační metoda	Baňka	V(standard) / ml	V(vzorek) / ml
MPS	S1	0,00	5,00
	S2	1,00	5,00
	S3	2,00	5,00
	S4	3,00	5,00
	S5	4,00	5,00
MKZ	K1	1,00	0,00
	K2	2,00	0,00
	K3	3,00	0,00
	K4	4,00	0,00
	K5	5,00	0,00

Absorbance byla měřena v křemenné kyvetě optické délky 1,00 cm v UV oblasti při vlnové délce 347 nm, ve které má chinin výrazné absorpční maximum. Měření bylo provedeno se všemi vzorky na obou spektrometrech. Při metodě přidavku po změření vlastnosti (spike) byly do kyvety nejdříve pipetovány 2,00 ml roztoku z baňky „spike“, tento roztok byl proměřen. Následně bylo do stejné kyvety přidáno 0,40 ml příslušného standardního roztoku chininu a byla proměřena absorbance vzniklého roztoku.

### 3.5 Postup měření metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Měření pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie bylo provedeno v RP modu na koloně XBridge BEH C18 (150×3,00 mm; 2,5 µm; Waters). Jako mobilní fáze byl použit 0,02 mol dm<sup>-3</sup> acetátový pufr pH = 4,00 (fáze B) a acetonitril (fáze A) v poměru 80:20 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml min<sup>-1</sup>. Byla použita fluorescenční detekce, excitační vlnová délka byla zvolena 325 nm, emisní vlnová délka byla zvolena 375 nm a DAD detekce při 347 nm. Objem nástřiku byl 2 µl. Měření probíhalo při laboratorní teplotě.



Jako kalibrační metody byly použity metoda kalibrační závislosti a metoda přídavku po změření vlastnosti (spike). Kalibrační řada byla připravena dle tab. 3.4. K přípravě kalibrační řady byl použit Standard 1. Roztoky pro kalibraci byly pipetovány do 5,00 ml odměrných baněk a následně naředěny po rysku MilliQ vodou.

**Tabulka 3.4**

Příprava kalibrační řady pro metodu HPLC. Objemy roztoku Standard 1 pipetované do 5,00 ml odměrné baňky

$c(\text{chinin}) / \text{mg dm}^{-3}$	$V(\text{standard}) / \text{ml}$
10	0,50
25	1,25
50	2,50
75	3,75
100	5,00

Vzorky byly zbaveny rozpuštěného oxidu uhličitého podobně jako v případě spektrometrie. Každý vzorek byl analyzován bez dalších úprav, přímo dávkován na kolonu. Při metodě přídavku po změření vlastnosti (spike) byl použit pouze Standard 1. Spikované vzorky byly připraveny do 5,00 ml odměrných baněk, do kterých byly pipetovány 4,00 ml vzorku a 1,00 ml Standardu 1.

### 3.6 Zpracování dat

Stanovení koncentrace chininu ve vzorcích pomocí spektrometrie bylo provedeno metodou kalibrační závislosti, metodou přídavku standardu a metodou přídavku po změření vlastnosti [20–22]. Pro určení funkce kalibrační závislosti byla využita metoda nejmenších čtverců, pomocí které se získá lineární závislost

$$A = a \cdot c(\text{chinin}) + b \quad (3.1)$$

kde  $A$  je absorbance,  $a$  je směrnice lineární závislosti [ $\text{mg}^{-1} \text{dm}^3$ ],  $b$  úsek lineární závislosti a  $c(\text{chinin})$  je koncentrace chininu [ $\text{mg dm}^{-3}$ ]. Koefficienty lineární závislosti byly vypočteny pomocí vzorců

$$a = \frac{n \sum c_i A_i - \sum c_i \sum A_i}{n \sum c_i^2 - (\sum c_i)^2} \quad (3.2)$$

$$b = \frac{\sum A_i - a \sum c_i}{n} \quad (3.3)$$

kde  $n$  je počet kalibračních bodů,  $c_i$  koncentrace  $i$ -tého roztoku chininu a  $A_i$  naměřená absorbance tohoto roztoku. Pomocí takto sestavené kalibrační přímky byla interpolací vypočtena koncentrace chininu ve vzorcích.

Nejistota regresních přímek byla stanovena pomocí standardní odchylky regresní přímky a standardních odchylek koeficientů regrese. Ty byly vypočteny podle vztahů

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum (A_i - \hat{A}_i)^2}{n - 2}} \quad (3.4)$$

$$s_a = \sqrt{\frac{s_r^2}{\sum (c_i - \bar{c})^2}} \quad (3.5)$$

$$s_b = \sqrt{\frac{s_r^2 \sum c_i^2}{n \sum (c_i - \bar{c})^2}} \quad (3.6)$$

kde  $s_r$  je standardní odchylka regresní přímky,  $s_a$  a  $s_b$  jsou standardní odchylky koeficientů regrese,  $\bar{c}$  je průměrná koncentrace chininu v měřeném roztoku,  $n$  je počet měření a  $\hat{A}_i$  je hodnota odpovídající  $c_i$  z regresní přímky.

Při kalibraci metodou standardního přídatku byla koncentrace chininu vypočtena extrapolací kalibrační křivky na nulový signál podle vzorce

$$c(\text{chinin}) = \frac{b}{a} \cdot \frac{V_{\text{celkový}}}{V_{\text{vzorek}}} \quad (3.7)$$

kde  $c(\text{chinin})$  je koncentrace chininu ve vzorku,  $a$ ,  $b$  koeficienty kalibrační závislosti,  $V_{\text{celkový}}$  objem analyzovaného roztoku [ml] a  $V_{\text{vzorek}}$  objem vzorku [ml].

Intervaly spolehlivosti pro stanovené koncentrace chininu ve vzorcích byly vypočteny užitím vzorce

$$s_{x_E} = \frac{s_r}{a} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{A}^2}{a^2 \sum (c_i - \bar{c})^2}} \quad (3.8)$$

kde  $s_{c_E}$  je standardní odchylka stanovené koncentrace,  $s_r$  je standardní odchylka regresní přímky (viz rovnice 3.4),  $a$  je směrnice přímky a  $\bar{A}$  je průměrná absorbance. Interval spolehlivosti je daný hodnotami  $c_E \pm ts_{x_E}$ , kde  $t$  je konstanta Studentova  $t$ -testu na hladině významnosti 0,05.

Při kalibraci metodou přídavku po změření vlastnosti byla koncentrace chininu vypočtena pomocí vzorce

$$c_x = \frac{\frac{V_s c_s}{V_s + V_x}}{\frac{S_2}{S_1} - \frac{V_x}{V_s + V_x}} \quad (3.9)$$

kde  $c_x$  je koncentrace chininu,  $c_s$  je koncentrace standardu přidávaného ke vzorku,  $V_x$  je objem vzorku,  $V_s$  je objem standardu,  $S_1$  je signál odpovídající čistému vzorku a  $S_2$  je signál odpovídající spikovanému roztoku. Vzorec byl odvozen pomocí soustavy dvou rovnic, které byly sestaveny na základě úvahy, že daná kalibrace je lineárního charakteru.

Směrodatné odchylky všech naměřených absorbancí byly vygenerovány přímo spektrometrem.

Stanovení koncentrace chininu ve vzorcích pomocí metody HPLC bylo provedeno metodou kalibrační závislosti a spikováním. Zpracování dat pomocí obou metod bylo provedeno obdobně jako u spektrometrie. Pro výsledné hodnoty duplikátů byl vypočten průměr a stanoven interval spolehlivosti.

Statistické zpracování naměřených hodnot bylo provedeno klasickými statistickými postupy na hladině významnosti 0,05. Pro stanovení směrodatných odchylek byl použit Studentův  $t$ -test. Pro zpracování výsledků a porovnávání metod byl využit  $F$ -test a analýza rozptylu ANOVA.

Grafy byly vytvořeny pomocí programu Origin 2018b (OriginLab Corporation, USA). Výpočty a tabulky byly prováděny v programu Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, USA). Molekulové struktury byly kresleny v programu ChemDraw (PerkinElmer, USA).

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Stanovení chininu ve vzorcích metodou UV spektrometrie

Metodou UV spektrometrie bylo stanovení koncentrace chininu v analyzovaných vzorcích toniků provedeno na dvou různých spektrometrech. Roztoky potřebné pro měření byly připraveny postupem uvedeným v odd. 3.4. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tab. 4.1.

**Tabulka 4.1**

Naměřené hodnoty absorbance při vlnové délce 374 nm v křemenné kyvetě optické délky 1,00 cm metodou UV spektrometrie pro jednotlivé analyzované vzorky toniků s použitím dvou různých spektrometrů a tří různých standardních roztoků chininu. Zkratky: MPS metoda přidavku standardu, MKZ metoda kalibrační závislosti, MSpike metoda přidavku po změření vlastnosti.

a) vzorek 1

Kalibrační metoda	Baňka	Spektrometr 1			Spektrometr 2		
		Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 1	Standard 2	Standard 3
MPS	S1	0,2425	0,2238	0,2193	0,2313	0,2297	0,2306
	S2	0,3194	0,2727	0,2797	0,2827	0,3039	0,2862
	S3	0,3881	0,3321	0,3408	0,3459	0,3680	0,3346
	S4	0,4284	0,3862	0,3992	0,3998	0,4348	0,3796
	S5	0,5065	0,4447	0,4558	0,4540	0,4667	0,4407
MKZ	K1	0,0631	0,0465	0,0491	0,0371	0,0785	0,0483
	K2	0,1221	0,0875	0,1019	0,0989	0,1098	0,1042
	K3	0,1696	0,1567	0,1523	0,1542	0,1831	0,1560
	K4	0,2317	0,2097	0,2047	0,2098	0,2232	0,2058
	K5	0,2756	0,2663	0,2615	0,2644	0,2965	0,2624
MSpike	vzorek	0,2226	0,2223	0,2386	0,2427	0,2192	0,2240
	vzorek + spike	0,4449	0,4624	0,4473	0,4559	0,4283	0,4242

Tabulka pokračuje na další straně.

**Pokračování tabulky 4.1 z předchozí strany.**

b) vzorek 2

Kalibrační metoda	Baňka	Spektrometr 1			Spektrometr 2		
		Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 1	Standard 2	Standard 3
MPS	S1	0,1565	0,1695	0,1474	0,1515	0,1881	0,1575
	S2	0,2057	0,2350	0,2002	0,2030	0,2227	0,2034
	S3	0,2618	0,2731	0,2528	0,2606	0,3058	0,2545
	S4	0,3188	0,3392	0,3138	0,3201	0,3327	0,3255
	S5	0,3763	0,3939	0,3707	0,3753	0,4068	0,3963
MKZ	K1	0,0453	0,0699	0,0448	0,0459	0,0908	0,0612
	K2	0,1016	0,1242	0,0975	0,0990	0,1125	0,1088
	K3	0,1612	0,1726	0,1582	0,1611	0,1948	0,1589
	K4	0,2169	0,2498	0,2138	0,2138	0,2326	0,2126
	K5	0,2723	0,2836	0,2637	0,2735	0,2978	0,2630
MSpike	vzorek	0,1740	0,1475	0,1650	0,1692	0,1624	0,1752
	vzorek + spike	0,3960	0,3671	0,3930	0,3847	0,3889	0,4061

c) vzorek 3

Kalibrační metoda	Baňka	Spektrometr 1			Spektrometr 2		
		Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 1	Standard 2	Standard 3
MPS	S1	0,0971	0,1028	0,1125	0,1214	0,0964	0,1074
	S2	0,1457	0,1521	0,1593	0,1461	0,1676	0,1508
	S3	0,2058	0,2087	0,2205	0,2215	0,2072	0,2223
	S4	0,2686	0,2691	0,2709	0,2715	0,2863	0,2948
	S5	0,3273	0,3303	0,3270	0,3636	0,3514	0,3357
MKZ	K1	0,0533	0,0660	0,0616	0,0723	0,0651	0,0644
	K2	0,1082	0,1141	0,1180	0,1156	0,1288	0,1059
	K3	0,1725	0,1754	0,1767	0,1958	0,1849	0,1740
	K4	0,2350	0,2328	0,2256	0,2316	0,2212	0,2187
	K5	0,2831	0,2820	0,2808	0,2971	0,2972	0,2715
MSpike	vzorek	0,1037	0,0993	0,1070	0,0767	0,0733	0,0844
	vzorek + spike	0,3633	0,3042	0,3640	0,3069	0,3006	0,3371

Tabulka pokračuje na další straně.

**Pokračování tabulky 4.1 z předchozí strany.**

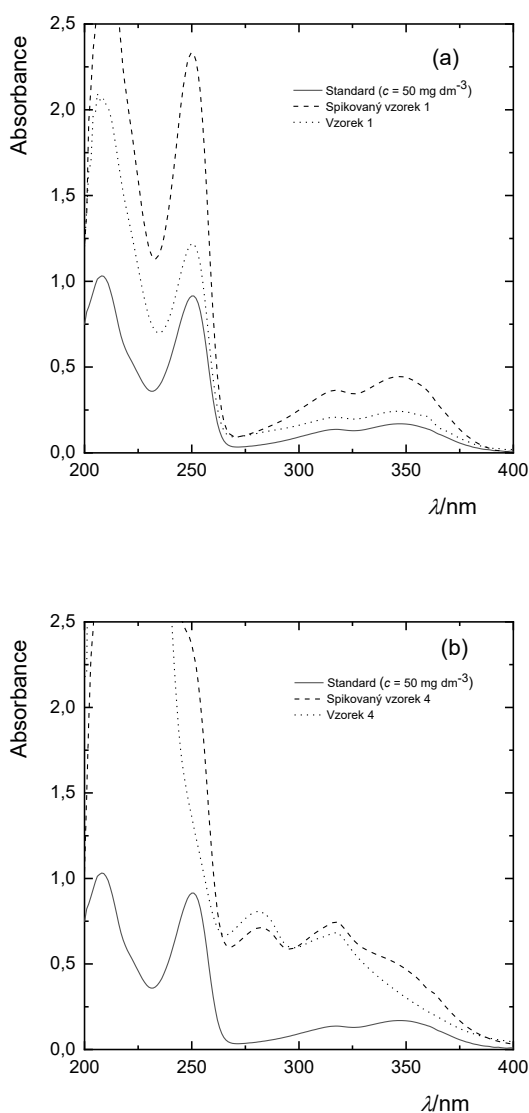
d) vzorek 4

Kalibrační metoda	Baňka	Spektrometr 1			Spektrometr 2		
		Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 1	Standard 2	Standard 3
MPS	S1	0,3289	0,3289	0,3289	0,3076	0,3076	0,3076
	S2	0,3762	0,3808	0,3624	0,3767	0,3493	0,3547
	S3	0,4238	0,4340	0,4304	0,4220	0,4311	0,4102
	S4	0,4975	0,4852	0,4891	0,4927	0,4757	0,4797
	S5	0,5546	0,5440	0,5240	0,5406	0,5455	0,5356
MKZ	K1	0,0663	0,0497	0,0150	0,0359	0,0389	0,0384
	K2	0,1163	0,1059	0,0663	0,0932	0,1155	0,1053
	K3	0,1713	0,1658	0,1306	0,1713	0,1561	0,1672
	K4	0,2302	0,2271	0,1839	0,2075	0,2130	0,2058
	K5	0,2703	0,2752	0,2361	0,2752	0,2811	0,2690
MSpike	vzorek	0,3143	0,3169	0,2905	0,3742	0,3251	0,3034
	vzorek + spike	0,4927	0,4995	0,4666	0,5613	0,5012	0,4911

e) vzorek 5

Kalibrační metoda	Baňka	Spektrometr 1			Spektrometr 2		
		Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 1	Standard 2	Standard 3
MPS	S1	0,0515	0,0550	0,0346	0,0612	0,0597	0,0764
	S2	0,1065	0,1164	0,0926	0,1035	0,1074	0,1304
	S3	0,1774	0,1631	0,1477	0,1578	0,1587	0,1832
	S4	0,2347	0,2242	0,2033	0,2181	0,2250	0,2390
	S5	0,2895	0,2795	0,2611	0,2689	0,2884	0,2994
MKZ	K1	0,0592	0,0678	0,0457	0,0404	0,0524	0,0765
	K2	0,1277	0,1309	0,1001	0,1228	0,1150	0,1374
	K3	0,1719	0,1927	0,1512	0,1624	0,1679	0,1874
	K4	0,2320	0,2409	0,2100	0,2128	0,2232	0,2466
	K5	0,2835	0,2949	0,2626	0,2809	0,2675	0,2977
MSpike	vzorek	0,0337	0,0494	0,0459	0,0547	0,0736	0,0404
	vzorek + spike	0,2732	0,2830	0,2683	0,2973	0,3007	0,2908

Na obr. 4.1 jsou pro ilustraci zobrazena naměřená UV spektra vzorků 1 a 4. Jako analytický signál byla vybrána absorbance při vlnové délce 347 nm. Na UV spektru vzorku 1 lze pozorovat, že při vlnové délce 347 nm je rozdíl u čistého vzorku a spikovaného vzorku dán pouze rozdílnou koncentrací chininu. Tvar spekter čistého vzorku a spikovaného vzorku se neliší od tvaru spektra standardního roztoku chininu. U vzorku 4 lze oproti tomu pozorovat, že obsahuje kromě chininu ještě další látky absorbující při vlnové délce 347 nm. Tvar spekter čistého vzorku a spikovaného vzorku se značně liší od spektra standardního roztoku chininu.



**Obrázek 4.1** Naměřené UV spektrum (a) vzorku 1 a (b) vzorku 4. Měřeno křemenné kyvetě optické délky 1,00 cm, vzorek ředěn vodou 1:4. Spikování 2,00 ml vzorku (ředěného 1:4) 400  $\mu$ l roztoku standardu.



Při stanovení koncentrace chininu pomocí metody kalibrační závislosti byly pomocí metody nejmenších čtverců stanoveny rovnice regresních přímek. Byla vypočtena nejistota regresních přímek podle vztahů (3.4), (3.5) a (3.6). Získané kalibrační rovnice jsou shrnuty v tab. 4.2. U všech kalibračních rovnic se úsek ukázal jako statisticky nevýznamný.

**Tabulka 4.2**

Koeficienty kalibračních rovnic regresních přímek stanovených pro metodu spektrometrie, rovnice má tvar  $A = (a \pm t \cdot s_a) c$ , kde  $A$  je absorbance a  $c$  je koncentrace chininu v měřeném roztoku

Vzorek	Spektrometr	Standard	$a / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3$	$t \cdot s_a / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3$
1	1	1	0,013	0,003
		2	0,014	0,004
		3	0,013	0,001
	2	1	0,014	0,004
		2	0,014	0,004
		3	0,013	0,001
2	1	1	0,014	0,003
		2	0,014	0,004
		3	0,014	0,002
	2	1	0,014	0,003
		2	0,013	0,006
		3	0,013	0,002
3	1	1	0,015	0,002
		2	0,014	0,002
		3	0,014	0,002
	2	1	0,014	0,004
		2	0,014	0,003
		3	0,013	0,002
4	1	1	0,013	0,003
		2	0,014	0,002
		3	0,014	0,009
	2	1	0,015	0,005
		2	0,015	0,004
		3	0,014	0,003
5	1	1	0,014	0,002
		2	0,014	0,004
		3	0,014	0,002
	2	1	0,014	0,003
		2	0,013	0,001
		3	0,014	0,005

Koncentrace chininu v jednotlivých analyzovaných vzorcích byla tedy metodou UV spektrometrie stanovena třemi kalibračními metodami s použitím třech různých standardních roztoků chininu a dvou různých spektrometrů. Výsledky stanovení koncentrace chininu v analyzovaných vzorcích toniků jsou shrnuty v tab. 4.3.

**Tabulka 4.3**

Stanovené koncentrace chininu v  $\text{mg dm}^{-3}$  v analyzovaných vzorcích toniků metodou UV spektrometrie. Zkratky: MPS metoda přidavku standardu, MKZ metoda kalibrační závislosti, MSpike metoda přidavku po změření vlastnosti.

Vzorek	Kalibrační metoda	Spektrometr 1			Spektrometr 2		
		Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 1	Standard 2	Standard 3
1	MPS	78	80,0	74,5	82,3	80	90
	MKZ	86,64	85,35	84,75	87,99	78,93	88,73
	Mspike	72	67	80	80	75	79
2	MPS	55,5	63	51,8	52,9	67	49
	MKZ	59,12	56,30	57,26	57,68	61,11	58,57
	Mspike	58	51	54	58	54	56
3	MPS	31,6	34,6	40,7	34	31	34
	MKZ	35,14	34,28	38,17	38,51	30,40	37,33
	Mspike	31	38	32	26	26	26
4	MPS	112	120,6	116	107	93	95
	MKZ	121,0	118,2	132,3	118,3	118,1	121,5
	Mspike	110	110	110	130	120	110
5	MPS	16,9	20,4	12,5	21,2	18,5	27,1
	MKZ	15,40	19,71	19,79	22,08	22,52	20,68
	Mspike	11	17	17	18	26	13

## 4.2 Stanovení chininu ve vzorcích metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Druhou instrumentální metodou použitou pro stanovení chininu ve vzorcích toniků byla vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Bylo použito metody kalibrační závislosti a metody přídatku po změření vlastnosti. Jako standardního roztoku chininu bylo použito pouze roztoku 1. Všechny analýzy byly provedeny v duplikátech. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tab. 4.4 a 4.5.

**Tabulka 4.4**

Naměřené plochy píku chininu (při retenčním čase 7,5 min) kalibrační řady pro HPLC stanovení chininu. Analyzováno na koloně XBridge BEH C18 (150×3,00 mm, 2,5 μm) isokratickou elucí s binární mobilní fází obsahující 0,02 mol dm<sup>-3</sup> acetátový pufr (pH = 4,00) a acetonitril v poměru 80:20 (v/v) při průtoku 0,5 ml min<sup>-1</sup>. Nástřik vzorku 2 μl. Excitační vlnová délka 325 nm, emisní vlnová délka 375 nm.

$c(\text{chinin}) / \text{mg dm}^{-3}$	$A / \text{mV min}^{-1}$
10	3267113
25	8341465
50	17075780
75	24684492
100	31879400

**Tabulka 4.5**

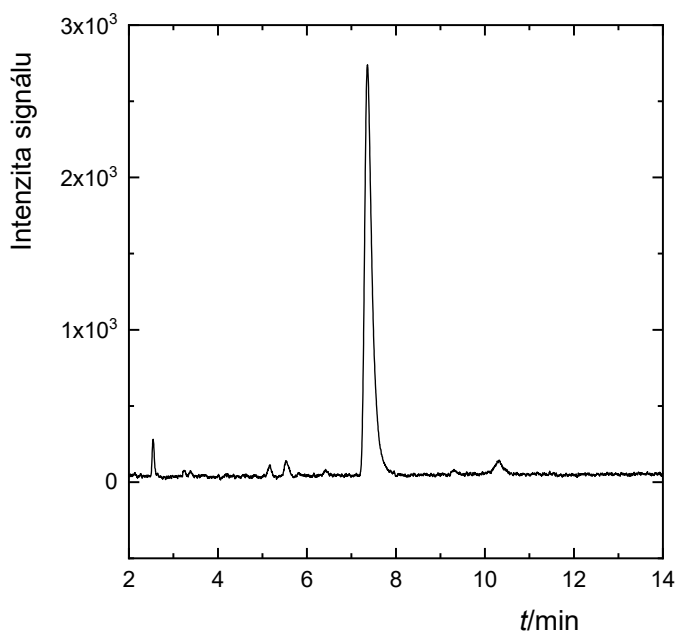
Naměřené plochy píků chininu (při retenčním čase 7,5 min) v analyzovaných vzorcích a spikovaných vzorcích. Analyzováno na koloně XBridge BEH C18 (150×3,00 mm, 2,5 μm) isokratickou elucí s binární mobilní fází obsahující 0,02 mol dm<sup>-3</sup> acetátový pufr (pH = 4,00) a acetonitril v poměru 80:20 (v/v) při průtoku 0,5 ml min<sup>-1</sup>. Nástřik vzorku 2 μl. Excitační vlnová délka 325 nm, emisní vlnová délka 375 nm.

Vzorek	Stanovení	$A / \text{mV min}^{-1}$	
		čistý vzorek	spikovaný vzorek
1	1.	25197270	26426444
	2.	25229657	26310217
2	1.	16430515	19348912
	2.	16432959	19409128
3	1.	10480622	14787063
	2.	10569081	15140881
4	1.	8484951	13618931
	2.	8548194	13492491
5	1.	2000945	8062328
	2.	1990300	8073946

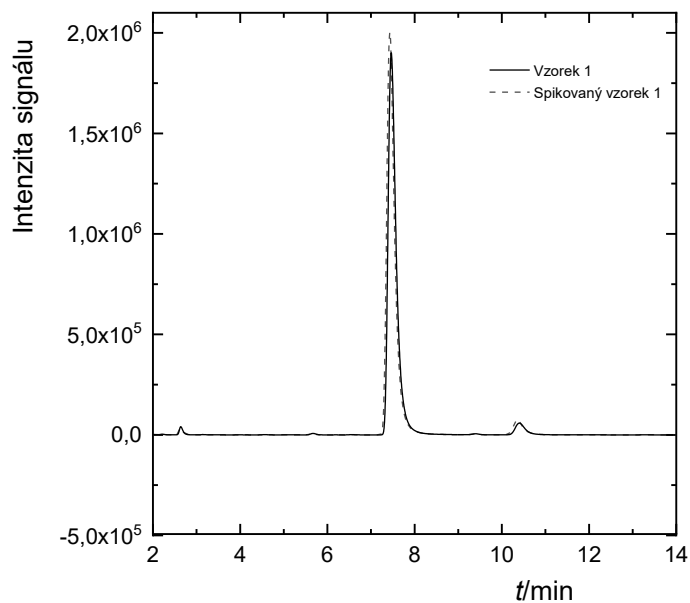
Na obr. 4.3–4.6 jsou pro ilustraci zobrazeny naměřené chromatogramy vzorku 1 a 4, chinin eluoval s retenčním časem 7,5 minut. Při porovnání HPLC-UV chromatogramů vzorků 1 (obr. 4.2) a 4 (obr. 4.4) lze pozorovat podobné rozdíly, jako při stanovení UV spektrometrií (viz odd. 4.1). Chromatogram vzorku 1 získaný pomocí HPLC-UV zobrazuje pouze pík odpovídající chininu, zatímco odpovídající chromatogram vzorku 4 zobrazuje celou řadu dalších píků, které rovněž absorbují při vlnové délce 347 nm. Z daných chromatogramů vyplývá, že stanovená koncentrace chininu u vzorku 4 (podobně také u vzorku 5) pomocí UV spektrometrie nebude odpovídat stanovené koncentraci chininu pomocí HPLC. Při UV spektrometrii nelze (na rozdíl od HPLC) separovat odezvy látek absorbujících při stejné vlnové délce, proto bude koncentrace stanovená pomocí UV spektrometrie nepravdivá a bude vyšší než koncentrace stanovená pomocí HPLC. Daný jev byl pravděpodobně způsoben přítomností dalších látek ve vzorcích 4 a 5.

Obrázky 4.3 a 4.5 představují chromatogramy vzorků 1 a 4 získané s fluorescenční detekcí. V chromatogramech je provedeno porovnání píků čistých vzorků a vzorků s přídavkem standardního roztoku chininu (spikovaných). Lze pozorovat, že čím vyšší je koncentrace chininu ve vzorku, tím menší je rozdíl mezi plochou píku spikovaného vzorku a plochou píku vzorku čistého. U vzorku 1, který obsahuje asi čtyřikrát více chininu než vzorek 5, je jen nepatrný rozdíl mezi píky, zatímco u vzorku 4 lze pozorovat značný rozdíl v plochách píků.

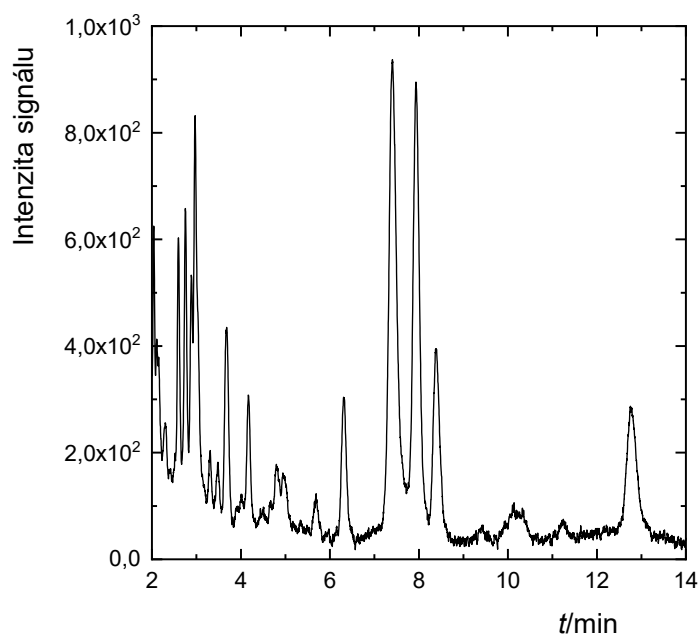
Při srovnání chromatogramů získaných různými detekcemi (UV a fluorescence) lze pozorovat, že fluoreskuje pouze chinin (v chromatogramu jediný výrazný pík). Díky fluorescenci chininu lze přesně stanovit koncentraci chininu i ve vzorcích, které obsahují další látky absorbující při vlnové délce 347 nm.



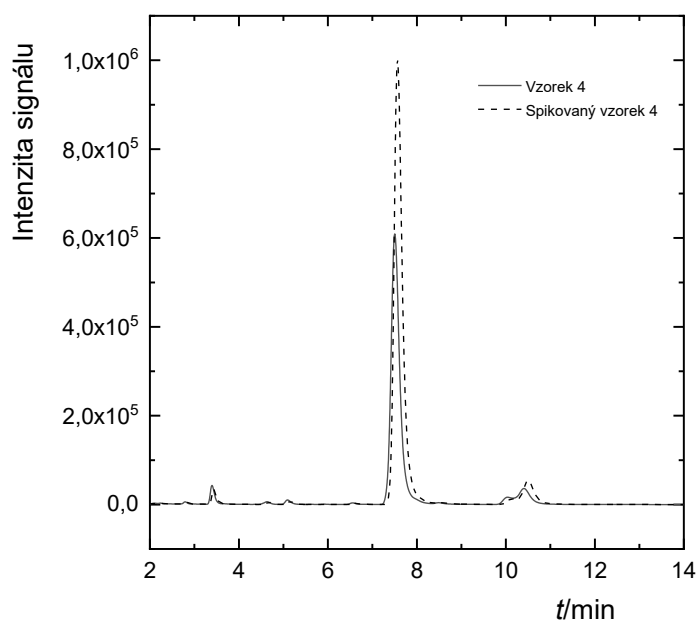
**Obrázek 4.2** HPLC-UV chromatogram vzorku 1 s UV detekcí při 347 nm, chininu odpovídá pík s retenčním časem 7,5 min. Analyzováno na koloně XBridge BEH C18 (150×3,00 mm, 2,5 μm) isokratickou elucí s binární mobilní fází obsahující 0,02 mol dm<sup>-3</sup> acetátový pufr (pH = 4,00) a acetonitril v poměru 80:20 (v/v) při průtoku 0,5 ml min<sup>-1</sup>. Nástržik vzorku 2 μl. Absorbance měřena při 347 nm.



**Obrázek 4.3** HPLC chromatogram vzorku 1 s fluorescenční detekcí, chininu odpovídá pík s retenčním časem 7,5 min. Analyzováno na koloně XBridge BEH C18 (150×3,00 mm, 2,5 μm) isokratickou elucí s binární mobilní fází obsahující 0,02 mol dm<sup>-3</sup> acetátový pufr (pH = 4,00) a acetonitril v poměru 80:20 (v/v) při průtoku 0,5 ml min<sup>-1</sup>. Nástržik vzorku 2 μl. Excitační vlnová délka 325 nm, emisní vlnová délka 375 nm.



**Obrázek 4.4** HPLC-UV chromatogram vzorku 4 s UV detekcí při 347 nm, chininu odpovídá pík s retenčním časem 7,5 min. Analyzováno na koloně XBridge BEH C18 (150×3,00 mm, 2,5  $\mu\text{m}$ ) isokratickou elucí s binární mobilní fází obsahující 0,02 mol  $\text{dm}^{-3}$  acetátový pufr (pH = 4,00) a acetonitril v poměru 80:20 (v/v) při průtoku 0,5 ml  $\text{min}^{-1}$ . Nástřik vzorku 2  $\mu\text{l}$ . Absorbance měřena při 347 nm.



**Obrázek 4.5** HPLC chromatogram vzorku 4 s fluorescenční detekcí, chininu odpovídá pík s retenčním časem 7,5 min. Analyzováno na koloně XBridge BEH C18 (150×3,00 mm, 2,5  $\mu\text{m}$ ) isokratickou elucí s binární mobilní fází obsahující 0,02 mol  $\text{dm}^{-3}$  acetátový pufr (pH = 4,00) a acetonitril v poměru 80:20 (v/v) při průtoku 0,5 ml  $\text{min}^{-1}$ . Nástřik vzorku 2  $\mu\text{l}$ . Excitační vlnová délka 325 nm, emisní vlnová délka 375 nm.

Koncentrace chininu v jednotlivých analyzovaných vzorcích byla tedy metodou HPLC stanovena dvěma kalibračními metodami (s použitím pouze jednoho standardního roztoku chininu). Výsledky stanovení koncentrace chininu v analyzovaných vzorcích toniků jsou shrnuty v tab. 4.6.

**Tabulka 4.6**

Stanovené koncentrace chininu v analyzovaných vzorcích toniků metodou HPLC.

Vzorek	$c/\text{mg dm}^{-3}$	
	metoda kalibrační závislosti	metoda přídavku po změření vlastnosti
1	77,58	82
2	50,06	52,8
3	31,6	32,2
4	25,3	25,3
5	4,84	6,18

#### 4.3 Porovnání výsledků stanovení chininu v nápojích získaných na dvou různých spektrometrech s pomocí tří standardních roztoků chininu

Pro porovnání vlivu obou použitých spektrometrů a třech různých standardních roztoků na výsledek stanovení chininu ve vzorcích metodou UV spektrometrie byla využita jednofaktoriální analýza rozptylu (ANOVA). Byly porovnány oba spektrometry pro stejný standardní roztok (standard 1) a všechny standardní roztoky na jednom spektrometru (spektrometr 1). Analýza byla provedena s výsledky pro vzorek 1 všech kalibračních metod. Výsledky jednotlivých ANOVA analýz jsou shrnuty v tab. 4.7 a tab. 4.8.

**Tabulka 4.7**

Analýza rozptylu výsledku stanovení chininu v tonicích při stanovení UV spektrometrií na dvou různých spektrometrech s využitím standardního roztoku chininu 1

<b>Zdroj variability</b>	<b>Suma čtverců</b>	<b>Počet stupňů volnosti</b>	<b>Průměr čtverců</b>	<b><i>F</i></b>	<b>Hodnota <i>P</i></b>	<b><i>F</i><sub>krit</sub></b>
<b>Vliv faktoru</b>	29,659267	1	29,659267	0,8024	0,4210	7,7086
<b>Reziduální variabilita</b>	147,846267	4	36,961567			
<b>Celkem</b>	177,505533	5				

**Tabulka 4.8**

Analýza rozptylu výsledku stanovení chininu v tonicích při stanovení UV spektrometrií na stejném spektrometru (spektrometr 1) s využitím tří různých standardních roztoků chininu

<b>Zdroj variability</b>	<b>Suma čtverců</b>	<b>Počet stupňů volnosti</b>	<b>Průměr čtverců</b>	<b><i>F</i></b>	<b>Hodnota <i>P</i></b>	<b><i>F</i><sub>krit</sub></b>
<b>Vliv faktoru</b>	7,817489	2	3,908744	0,0692	0,9339	5,1433
<b>Reziduální variabilita</b>	338,878867	6	56,479811			
<b>Celkem</b>	346,696356	8				

Při porovnání získaných hodnot  $F$  a  $F_{\text{krit}}$  je zřejmé, že vypočítané hodnoty  $F$  jsou v obou případech menší než hodnoty  $F_{\text{krit}}$ . Nulovou hypotézu lze tedy považovat za pravdivou a lze konstatovat, že měření na rozdílných spektrometrech a s rozdílnými standardními roztoky nemělo na výsledky stanovení chininu v nápojích metodou UV spektrometrie žádný významný vliv.

#### 4.4 Porovnání výsledků stanovení chininu v nápojích získaných pomocí různých kalibračních a instrumentálních metod

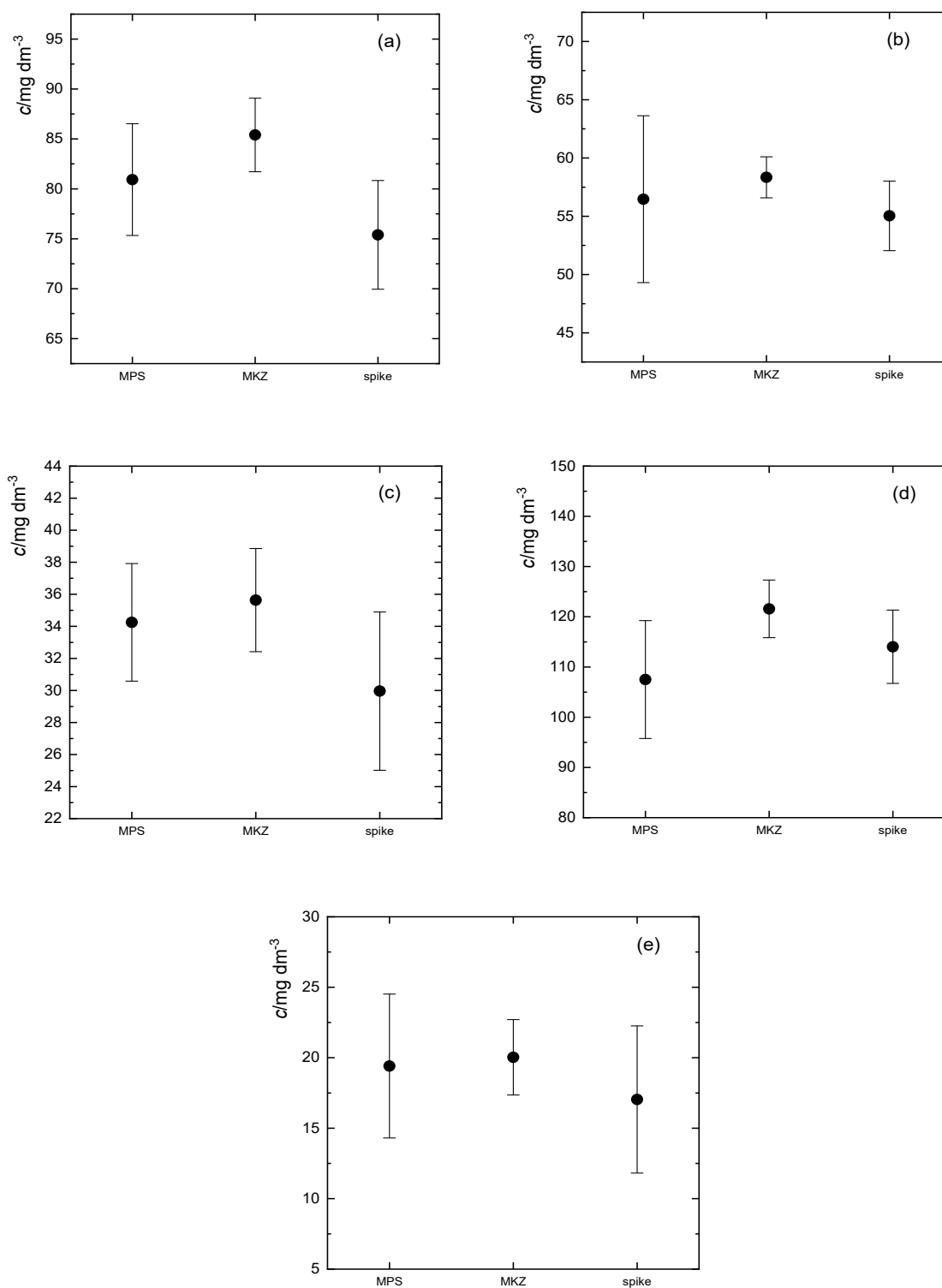
Hlavním cílem této práce je srovnat jednotlivé kalibrační metody. Na obr. 4.6 je zobrazeno srovnání výsledků stanovení chininu v nápojích metodou UV spektrometrie pomocí všech použitých kalibračních metod. Vzhledem ke zjištění (viz odd. 4.3), že na výsledky nemá žádný významný vliv užití různých roztoků standardů ani různých spektrometrů, byly grafy sestaveny ze všech měřených hodnot. Lze pozorovat, že metoda kalibrační závislosti má ze všech použitých kalibračních metod nejmenší rozptyl, je tedy



nejpreciznější. Jednotlivé 95% intervaly výskytu hodnot jednotlivých kalibračních metod se u všech vzorků překrývají s výjimkou vzorku 1, kde se metoda kalibrační závislosti a metoda přidavku po změření vlastnosti (spike) nepřekrývají. Z hlediska pravdivosti jednotlivých kalibračních metod nelze při použití jedné metody – tedy UV spektrometrie – určit, která je nejpravdivější.

Časově nejvýhodnější je metoda přidavku po změření vlastnosti (spike), ke které stačí pouze dvě měření. U dalších dvou použitých kalibračních metod je potřeba připravit více roztoků, v případě této práce bylo u každé připraveno pět roztoků.

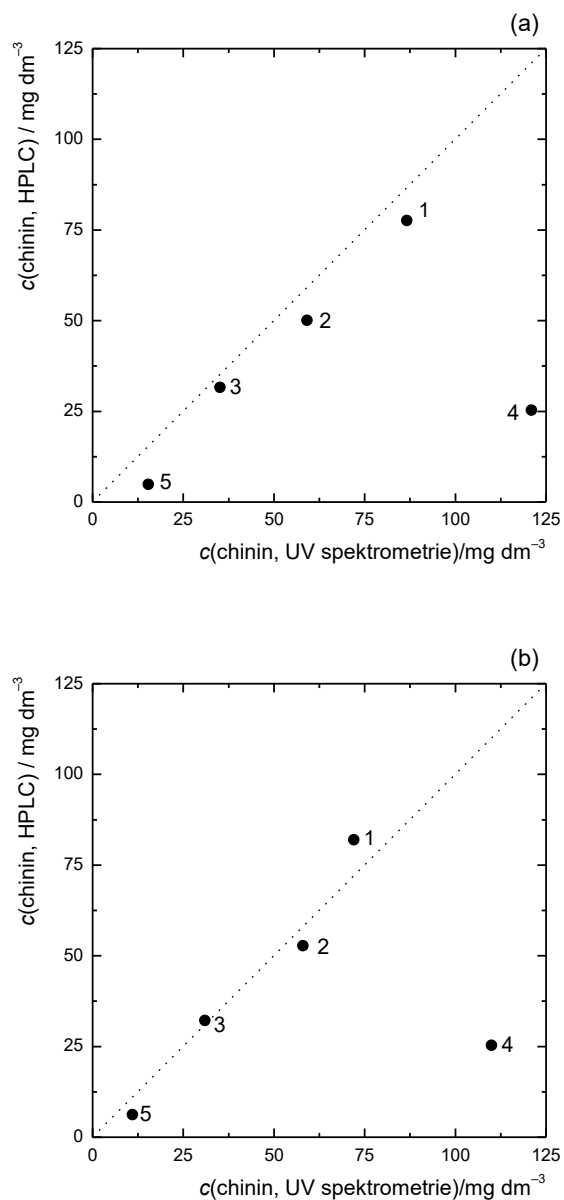
Při srovnání výsledků stanovení chininu v nápojích metodou UV spektrometrie a HPLC lze – jak bylo diskutováno v odd. 4.2 – pozorovat značné rozdíly u vzorků 4 a 5. Koncentrace chininu stanovené UV spektrometrií se pro tyto dva vzorky značně liší od těch stanovených pomocí HPLC. Vzhledem k užití fluorescenční detekce u HPLC, která detekuje pouze fluoreskující chinin a žádné jiné interferenty, lze uzavřít, že HPLC je pravdivější než UV spektrometrie, protože umožňuje separaci interferentů ve spojení se selektivní fluorescenční detekcí.



**Obrázek 4.6** Srovnání výsledků stanovení chininu v nápojích metodou UV spektrometrie pomocí všech použitých kalibračních metod: (a) vzorek 1, (b) vzorek 2, (c) vzorek 3, (d) vzorek 4, (e) vzorek (5). Znázorněno pomocí průměru koncentrací stanovených danou kalibrační metodou a 95% intervalu spolehlivosti. Zkratky: MPS metoda přidavku standardu, MKZ metoda kalibrační závislosti, MSpike metoda přidavku po změření vlastnosti.

## 5 Závěr

Pomocí dvou instrumentálních metod, UV spektrometrie a HPLC s UV a fluorescenční detekcí, byly pro stanovení chininu v autentických vzorcích nápojů porovnány metoda kalibrační závislosti, metoda přidavku standardu a metoda přidavku po změření vlastnosti (spike). U UV spektrometrie byly kalibrační metody porovnávány z hlediska pravdivosti, preciznosti a časové náročnosti. Nejpreciznější byla metoda kalibrační závislosti z důvodu nejmenšího rozptylu výsledných koncentrací chininu. Nebylo možné stanovit, která z metod je nejpravdivější. Časově nejméně náročná byla metoda přidavku po změření vlastnosti (spike), další dvě metody byly časově náročnější. Při srovnání UV spektrometrie a HPLC byla metoda HPLC pravdivější z důvodu separace interferentů. Obrázek 5.1 zobrazuje korelaci mezi výsledky získanými UV spektrometrií a HPLC pomocí standardního roztoku chininu 1 a metod kalibrační závislosti a metody přidavku po změření vlastnosti (spike). Nejvíce odlehlý je bod odpovídající vzorku 4, u kterého byly výsledky získané UV spektrometrií a HPLC nejvíce odlišné. U ostatních čtyř analyzovaných vzorků lze výsledky získané UV spektrometrií a HPLC považovat za korelující, tedy pravdivé, odpovídající skutečnému obsahu chininu v analyzovaných vzorcích.



**Obrázek 5.1** Korelace výsledných koncentrací chininu v analyzovaných vzorcích nápojů 1–5 stanovených UV spektrometrií a HPLC při užití (a) metody kalibrační závislosti a (b) metody přidavku po změření vlastnosti (spike).

## Literatura

- [1] Kluska, M.; Marciniuk-Kluska, A.; Prukala, D.; Prukala, W. Analytics of quinine and its derivatives. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2016**, *46* (2), 139–145.
- [2] Nicolaou, K. C.; Montagnon, T. *Molecules that Changed the World*. Wiley-VCH, Weinheim. 2008.
- [3] Samanidou, V. F.; Evaggelopoulou, E. N.; Papadoyannis, L. N. Simple and rapid HPLC method for the determination of quinine in soft drinks using fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2004**, *27* (15), 2397–2406.
- [4] Awasthi, S.; Srivastava, A.; Singla, M.L. Voltammetric determination of citric acid and quinine hydrochloride using polypyrrole–pentacyanonitrosyl-ferrate/platinum electrode. *Synthetic Metals*. **2011**, *161* (15–16), 1707–1712.
- [5] Feas, X.; Fente, C. A.; Cepeda, A. Fast and sensitive new high performance liquid chromatography laser induced fluorescence (HPLC-LIF) method for quinine. comparative study in soft drinks. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2009**, *32* (17), 2600–2614.
- [6] Florey, K. *Analytical Profiles of Drug Substances. Vol. 12*. Academic Press, New York. 1983, p. 547–621.
- [7] Tzanavaras, P. D.; Zacharis, C. K.; Karakosta, T. D.; Zotou, A.; Themelis, D. G. High-throughput determination of quinine in beverages and soft drinks based on zone-fluidics coupled to monolithic liquid chromatography. *Anal. Lett.* **2013**, *46* (11), 1718–1731.
- [8] Kaufman, T. S.; Rúveda, E. A. The quest for quinine: Those who won the battles and those who won the war. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (6), 854–885.
- [9] Stork, G.; Niu, D.; Fujimoto, A.; Koft, E. R.; Balkovec, J. M.; Tata, J. R.; Dake, G. R. The first stereoselective total synthesis of quinine. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (14), 3239–3242.
- [10] Streller, S.; Roth, K. Von der Apotheke an die Bar: Eine Rinde Erobert die Welt. *Chem. Unserer Zeit.* **2012**, *46*, 228–247.
- [11] Mikus, P.; Marakova, K.; Veizerova, L.; Piest’ansky, J. Determination of quinine in beverages by online coupling capillary isotachophoresis to capillary zone electrophoresis with UV spectrophotometric detection. *J. Sep. Sci.* **2011**, *34* (23), 3392–3398.
- [12] Reijenga, J.; Aben, G.; Lemmens, A.; Verheggen, T.; Debruijn, C.; Everaerts, F. Determination of quinine in beverages, pharmaceutical preparations and urine by isotachophoresis. *J. Chromatogr.* **1985**, *320* (1), 245–252.
- [13] Chen, Q. C.; Wang, J. Determination of quinine in drinks by reversed-phase ion-pair chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2001**, *24* (9), 1341–1352.
- [14] Kudlacek, K.; Nesmerak, K.; Sticha, M.; Kozlik, P.; Babica, J. Historical injection solutions of quinine analyzed by HPLC/MS. *Monaths. Chem.* **2017**, *148* (9), 1613–1618.

- [15] Holmfred, E.; Cornett, C.; Maldonado, C.; Rønsted, N.; Hansen, S. H. An optimised method for routine separation and quantification of major alkaloids in cortex cinchona by HPLC coupled with UV and fluorescence detection. *Phytochem. Anal.* **2017**, *28* (5), 374–380.
- [16] Maldonado, C.; Barnes, C.; Cornett, C.; Holmfred, E.; Hansen, S.; Persson, C.; Antonelli, A.; Rønsted, N. Phylogeny predicts the quantity of antimalarial alkaloids within the iconic yellow *Cinchona* bark (Rubiaceae: *Cinchona calisaya*). *Front Plant Sci.* **2017**, *8*, 391.
- [17] Rudo, A.; Zeller, K.-P.; Siehl, H.-U.; Berger, S.; Sicker, D. Chinin, ein legendäres Alkaloid. Bittere Medizin und bitteres Vergnügen. *Chem. Unserer Zeit* **2018**, *52* (4), 238–248.
- [18] Meyer, C. G.; Marks, F.; May, J. Editorial: Gin tonic revisited. *Trop. Med. Int. Health* **2004**, *9* (12), 1239–1240.
- [19] May, P.; Cotton, S. *Molecules That Amaze Us*. CRC Press 2014.
- [20] Koscielniak, P.; Wieczorek, M. Univariate analytical calibration methods and procedures: A review. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *944*, 14–28.
- [21] Koscielniak, P. Univariate calibration techniques in flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *438* (1–2), 323–333.
- [22] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, J. F.; Crouch, S.R. *Analytická chemie*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2019.